

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-510168

(P2004-510168A)

(43) 公表日 平成16年4月2日 (2004. 4. 2)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>

GO 1 N 27/447

CO 7 K 1/26

F I

GO 1 N 27/26 3 1 5 H

CO 7 K 1/26

GO 1 N 27/26 3 1 5 B

GO 1 N 27/26 3 1 5 D

テーマコード (参考)

4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 47 頁)

(21) 出願番号 特願2002-531156 (P2002-531156)  
 (86) (22) 出願日 平成13年9月28日 (2001. 9. 28)  
 (85) 翻訳文提出日 平成15年3月28日 (2003. 3. 28)  
 (86) 国際出願番号 PCT/AU2001/001229  
 (87) 国際公開番号 W02002/026773  
 (87) 国際公開日 平成14年4月4日 (2002. 4. 4)  
 (31) 優先権主張番号 PR 0515  
 (32) 優先日 平成12年9月29日 (2000. 9. 29)  
 (33) 優先権主張国 オーストラリア (AU)

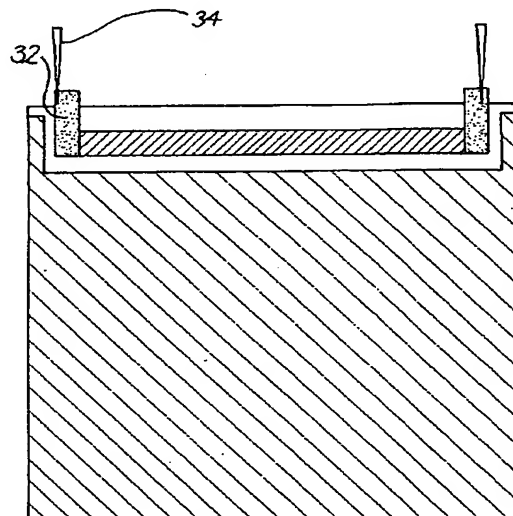
(71) 出願人 501067573  
 プロテオム システムズ リミテッド  
 オーストラリア国 ニューサウスウェール  
 ズ州 2 1 1 3 ノース ライド ウォー  
 ターロー ロード 3 5 - 4 1  
 (74) 代理人 100077931  
 弁理士 前田 弘  
 (74) 代理人 100094134  
 弁理士 小山 廣毅  
 (74) 代理人 100110939  
 弁理士 竹内 宏  
 (74) 代理人 100110940  
 弁理士 嶋田 高久  
 (74) 代理人 100113262  
 弁理士 竹内 祐二

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 電気泳動システム

## (57) 【要約】

2次元電気泳動によりサンプルを成分に分離する方法は、間隔を置いて配置され、1つの略平面状の支持手段に担持される I P G ストリップ及びスラブゲルを使用する。平面状の支持手段は、最初は略鉛直面の向きに置かれ、第1の電気泳動分離媒体は、第2の電気泳動分離媒体の上方又は下方に間隔をあけて水平面の向きに置かれる。その後、I P G ストリップ内のサンプル混合液の第1の分離が実行され、その間、I P G ストリップとスラブゲルは、略水と不混和性で水を抽出不可能な非導電性液、好ましくはパラフィン油により隔離されている。1次元目の分離を実行した後、支持手段を傾斜させ、I P G ストリップが水平に対してある角度になるようにし、パラフィン油を I P G ストリップとスラブゲルの間の間隙から流し出す。次に、緩衝液含有アガロースゲルを間隙内に流し込み、電界の影響下でサンプル分子が I P G ストリップからスラブゲルへ移動するのを可能にする。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

2次元電気泳動によりサンプルを成分に分離する方法であって、

- a. 長いストリップからなる第1の電気泳動分離媒体と第2の電気泳動分離媒体を、1つの支持手段上に互いに間隔を置いて担持された状態で提供することと、
- b. 上記平面状支持手段を略鉛直面の向きに置き、上記第1の電気泳動分離媒体を上記第2の電気泳動分離媒体の上方又は下方に間隔をあけて水平面の向きに置き、上記第1の媒体と上記第2の媒体とを略水と不混和で水を抽出不可能な非導電性の液体により隔離させた状態で、上記第1の電気泳動分離媒体内でサンプル混合液に対する1次元目の分離を実行することと、
- c. 上記1次元分離を実行した後、上記第1の電気泳動分離媒体が水平に対してある角度になるように上記支持手段を傾斜させ、上記液体を上記第1の電気泳動分離媒体と上記第2の電気泳動分離媒体との間の間隙から流し出すことと、
- d. 架橋材料を含有する液状の緩衝剤を上記間隙に流し、電界の影響下でサンプル分子を上記第1の電気泳動分離媒体から上記第2の電気泳動分離媒体への移動させることとを備えた方法。

10

## 【請求項 2】

上記第1の電気泳動分離媒体は、取外し可能な金属箔のカバーで少なくとも部分的に封入されており、

上記金属箔のカバーは、分離すべきサンプルを含んだ液体を上記支持手段を鉛直姿勢にした状態で使用することにより、上記媒体の再水和を可能にするものである請求項1記載の方法。

20

## 【請求項 3】

上記非導電性の液体は、パラフィン油である請求項1又は2に記載の方法。

## 【請求項 4】

上記第1の電気泳動分離媒体は、IPGストリップからなっている上記請求項のいずれか1つに記載の方法。

## 【請求項 5】

上記第2の電気泳動分離媒体は、スラブゲルからなっている上記請求項のいずれか1つに記載の方法。

30

## 【請求項 6】

上記支持手段は、略平面状の支持体からなっている上記請求項のいずれか1つに記載の方法。

## 【請求項 7】

上記架橋材料を含有する液状の緩衝剤は、緩衝剤含有アガロースゲルからなっている上記請求項のいずれか1つに記載の方法。

## 【請求項 8】

2次元電気泳動によりサンプルを成分に分離することを行う装置であって、

長いストリップからなる第1の電気泳動分離媒体と、

1つの略平面状の支持手段上に、上記第1の媒体と互いに間隔を置いて担持された第2の電気泳動分離媒体と、

40

上記平面状の支持手段と共に上記長いストリップを封入する薄膜からなる被覆手段とを備えた装置。

## 【請求項 9】

上記被覆手段を構成する上記薄膜は、導電性である請求項8記載の装置。

## 【請求項 10】

上記被覆手段を構成する上記薄膜は、金属箔からなっている請求項9記載の装置。

## 【請求項 11】

上記両媒体は、1～4mmの間隙だけ離れて配置されている請求項8記載の装置。

## 【請求項 12】

50

上記固体の支持手段は、前壁、後壁及び互いに対向する側壁を有するカセットの一部を形成し、

上記長いストリップの各端は、上記カセットの隣接する上記側壁から約5mmの間隙だけ隔離されている請求項8又は9に記載の装置。

【請求項13】

上記カセットは、上記長いストリップの各端に隣接して幅広の電極橋渡し部分を形成している請求項12記載の装置。

【請求項14】

平面状の支持面を有するカセットケースと、

上記平面状の支持面に支持された長いストリップからなる第1の電気泳動分離媒体と、 10

上記平面状の支持面に支持されたスラブからなる第2の電気泳動分離媒体と、

上記カセットケースの平面状の支持手段と共に上記第1の媒体を封入する取外し可能な薄膜カバーとを備えており、

上記カセットケースは、上記第1及び第2の媒体の間に液体保持用の空間を形成している2次元電気泳動ゲルカセット。

【請求項15】

上記第1の媒体は脱水状態であり、

上記取外し可能な薄膜カバーは、上記第1の媒体を再水和するように連通する液体保持用の空間を上記第1の媒体の周囲に形成するように開放可能である請求項14記載のカセット。 20

【請求項16】

上記取外し可能な薄膜カバーは、上記平面状支持手段が略鉛直姿勢をとったときに液体保持用の空間を形成するように開放している請求項14記載のカセット。

【請求項17】

上記取外し可能な薄膜カバーは、導電性である請求項14記載のカセット。

【請求項18】

上記取外し可能な薄膜カバーは、金属箔からなっている請求項14記載のカセット。

【請求項19】

上記取外し可能な薄膜カバーは、導電性プラスチック箔からなっている請求項14記載のカセット。 30

【請求項20】

平面状の支持面を有するカセットケースと、

上記平面状の支持面に支持された長いストリップからなる第1の電気泳動分離媒体と、

上記平面状の支持面に支持されたスラブからなる第2の電気泳動分離媒体と、

上記カセットケースの平面状の支持面と共に上記第1の媒体を封入する取外し可能な薄膜カバーとを備えており、

上記カセットケースは、上記第1及び第2の媒体の間に液体を保持する空間を形成しており、

上記カバーを取り外した状態で、上記第1の媒体を使用して電気泳動分離が行われるように、非導電性の液体が上記第1及び第2の媒体の間の上記液体保持用の空間内に配置される2次元電気泳動ゲルカセット。 40

【請求項21】

平面状の支持面を有するカセットケースと、

上記平面状の支持面に支持された長いストリップからなる第1の電気泳動分離媒体と、

上記平面状の支持面に支持されたスラブからなる第2の電気泳動分離媒体と、

上記カセットケースの平面状の支持面と共に上記第1の媒体を封入する取外し可能な薄膜カバーとを備えており、

上記カセットケースは、上記第1及び第2の媒体の間に液体を保持する空間を形成しており、

上記カバーを取り外した状態で、上記第2の媒体を使用して上記第1の媒体内で電気泳動 50

分離された物質の電気泳動分離が行われるように、１次元目の電気泳動分離に使用された上記第１の媒体と、架橋材料が、上記第１及び第２の媒体の間の上記液体保持用の空間内に配置される２次元電気泳動ゲルカセット。

【請求項２２】

平面状の支持面を有するケースと、上記平面状の支持面に支持された長いストリップからなる第１の電気泳動分離媒体と、上記平面状の支持面に支持されたスラブからなる第２の電気泳動分離媒体と、上記カセットケースの平面状の支持面と共に上記第１の媒体を封入する取外し可能な薄膜カバーとを備えたカセットを使用して２次元電気泳動によりサンプルを成分に分離する方法であって、

上記カバーを取り外し、上記サンプルを上記第１の媒体内に導入し、非導電性の液体を上記第１及び第２の媒体の間に導入することと、

上記第１の媒体を用いて第１の電気泳動分離を実行することと、

上記非導電性液体を架橋材料と入れ換えることと、

第２の媒体を用いて、上記第１の電気泳動分離で分離された物質の第２の電気泳動分離を実行することとを備えた方法。

【請求項２３】

上記第１の媒体は、初めは脱水状態にされており、

液体を保持可能な室を囲む空間を形成するように上記カバーを開放し、上記空間内に上記第１の媒体の再水和が可能にする液体を導入する工程をさらに備えた請求項２２記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

（技術分野）

本発明は１次元ゲルと２次元ゲルとが１つのカセットに含まれている構造で２次元電気泳動を行う方法に関する。

【０００２】

（発明の背景）

最近２５年間、２－Ｄ ＰＡＧＥ（２次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動）は、ある細胞種のタンパク質組成を分析したり、さまざまな細胞の機能を調整する数千のタンパク質の量的及び質的な分析により遺伝子の活動の変化を監視するための最適の技術であった。その並外れた分解能にも拘わらず、これまで２－Ｄ ＰＡＧＥは高スループットのスクリーニング研究には採用されなかった。その理由は、１次元ゲルと２次元ゲルが別々に実験にかけられるので、別々の実験装置を２つ必要とし、よって自動化が難しいことである。さらに、２－Ｄゲルをうまく完成させるには、操作者の高度な技術と知識が必要とされる。

【０００３】

２－Ｄゲルを正確に高スループットかつ高再現性で実現するためには、可能な限り操作者の介入をなくすことが必要である。このことは、１次元ゲルと２次元ゲルとを１つのカセットに組み合わせ、操作者がこれらのゲルを手で扱う必要性をなくすことにより実現可能である。この人間の手が介在する工程は、低速、非能率で操作者間の差が発生する原因となり、結果として再現性がなくなる。２つのゲルを１つのカセットに組み合わせる別の利点は、実行ハードウェアを１つの装置に減らすことで、自動化の可能性が増すことである。２つのゲルを１つのカセットに配置するには、２つのゲルを数ｍｍ以内の間に配置し、かつタンパク質の１次元目から２次元目への移動が必要になるまでゲル間の隔離を維持できることが必要になる。１次元ゲルと２次元ゲルとを１つのカセットに組み合わせることは、重大な技術的難題を伴う。第１に、２つのゲルに存在する各溶液及びそのときのイオン状態が極めて異なっていることである。１次元ゲル、すなわち等電点電気泳動ゲルは、非常にイオン強度が低く、高濃度の塩又は緩衝液と混在できない。等電点電気泳動は、１０，０００ボルトまでの高電圧と、通常はゲル当たり１ｍＡ以下の非常に低い電流で行われる。反対に、２次元ゲルは、通常１００～５００ｍＭの範囲の高濃度の緩衝塩を含み、

その電気泳動は、ゲル当たり5～100mAの高電流で行われる。よって、これら2つのゲルを非常に近接して配置する場合、2次元ゲルからの緩衝液で1次元ゲルが汚染し、その結果、1次元ゲルに非常に高い電流が流れて1次元ゲルを燃焼させてしまうことを確実に起こさないように注意する必要がある。

#### 【0004】

第2の直面する難題は、サンプル中のいかなる物質も2次元ゲルへ早く移動させ過ぎることなく、サンプルを1次元ゲル上に装入することである。等電点電気泳動を実施する最良の方法は、固定化pH勾配(IPG)を利用することである。IPGは、普通、乾燥ストリップとして供給され、サンプル溶液で再水和されることにより、サンプルをゲル全体に分散させるので、多量のタンパク質を装入することができる。2つのゲルを1つのカセットに組み合わせる場合、サンプルの一部を2次元ゲルへ移動させることなく、サンプルでIPGの表面全体を湿潤させるのは困難である。

10

#### 【0005】

2次元電気泳動の実施を目的として、ゲルストリップとスラブゲルを組み合わせる試みがなされてきた。米国特許第4874490号にはそのような装置が開示されている。しかしながら、この提案された方法は扱い難くまた実用的でもなく、方法の実施例や作用例も提示されていない。プロテオミクス分野への関心が最近急激に高まるに連れて、以前よりもはるかに多くの分離を行うことが必要になってきている。分離、特に2次元分離は手間がかかり、この分野の従事者の生産性を増加させる唯一の実用的な方法は、自動化が可能な方法又はシステムを提供することである。米国特許第4874490号に示す方法は、実際に動作するとしても、機械化するのとは不可能ではないが困難である。

20

#### 【0006】

米国特許第5773645号には、共通の支持体上で2次元分離を実施する別の装置が開示されている。一方でこの明細書は、装置を使用した例や結果を全く開示していない。さらに、開示されたシステムは自動化するのが難しくまた高価である。

#### 【0007】

本発明の目的の1つは、提供する方法やシステムが自動化できるように1次元ゲルと2次元ゲルを1つのカセットに組み合わせて実験することに伴う技術的な難題を克服する新しい方法を提供することである。

#### 【0008】

本明細書に含まれる文献、作用、物質、装置、物品等のいずれの説明も、もっぱら本発明の背景を提示することを目的としている。これらの事項のいずれか又はいずれも、従来技術の基礎の一部を形成するものである、又は本出願の各請求項の優先日以前にオーストラリアに存在したような本発明と関連する技術分野における一般的な知識であるということを確認したものとはみなされるべきではない。

30

#### 【0009】

##### (発明の概要)

第1の基本的な態様では、本発明の基となる概念は、1次元目等電点電気泳動ゲルと2次元目電気泳動ゲルの組合せ、保存、輸送及び実験を1つのカセットで可能にし、自動化が可能な新規の方法を提案することである。

40

#### 【0010】

第2の態様では、本発明は、1次元ゲルをサンプルであるタンパク質やポリペプチドの溶液で再水和する方法を提供する。この再水和は、カセット内で、サンプル溶液が2次元ゲルへ移動することなく起こる。

#### 【0011】

第3の態様では、本発明は、等電点電気泳動を実行している間に、電流を絶縁する障壁を1次元ゲルと2次元ゲルの間に配置する方法を提供する。この障壁は2つのゲルのカセット内での脱水を防止し、さらにサンプルの1次元ゲルから2次元ゲルへの早過ぎる移動や緩衝塩の2次元ゲルから1次元ゲルへの移動を防止する。

#### 【0012】

50

本発明の別の態様は、電流絶縁障壁を除去し、緩衝液を含浸した導電性の架橋材料、好ましくはゲルを提供することにより、１次元ゲルを２次元ゲルと接続する方法である。架橋材料により、タンパク質の１次元ゲルから２次元ゲルへの移動が可能になる。

【００１３】

本発明のさらに別の態様は、１次元ゲルの両端を電氣的に接続して電気泳動の進行を可能にする手段である。

【００１４】

ある特定の態様では、２次元電気泳動によりサンプルを成分に分離する方法であって、

a. 通常はＩＰＧストリップである長いストリップからなる第１の電気泳動分離媒体と、通常はスラブ形状の第２の電気泳動分離媒体を、１つの略平面状の支持手段上に互いに間隔を置いて担持された状態で提供することと、

10

b. 上記平面状支持手段を略鉛直面の向きに置き、上記第１の電気泳動分離媒体を上記第２の電気泳動分離媒体の上方又は下方に間隙をあけて水平面の向きに置き、上記第１の媒体と上記第２の媒体とを低粘度、低揮発性で略非可燃性であり、略水と不混和で水を抽出不可能な非導電性液体により隔離させた状態で、上記第１の電気泳動分離媒体内でサンプル混合液に対する１次元目の分離を実行することと、

c. 上記１次分離を実行した後、上記第１の電気泳動分離媒体を水平に対してある角度になるように上記支持手段を傾斜させ、上記液体を上記第１の電気泳動分離媒体と上記第２の電気泳動分離媒体の間の間隙から流し出すことと、

d. 架橋材料を含む液状の緩衝剤、通常は緩衝剤含有アガロースゲルを上記間隙に流し、電界の影響下でサンプル分子を上記第１の電気泳動分離媒体から上記第２の電気泳動分離媒体へ移動させることとを備えた方法が提供される。

20

【００１５】

ここで用いられている「水を抽出不可能な」という表現は、水と全く不混和で、従って少しの水も吸収も吸着もしない液体を含む。一般的には水と不混和であると言われながら、実際には、飽和して２層化する前に多量の水を吸収する可能性がある溶媒は多数存在する。このような溶媒は、まだ水分飽和していない場合には、ゲルやＩＰＧストリップから水を取り出し、脱水させてしまう可能性があり、飽和している場合には、１２時間から４８時間はかかるＩＰＧストリップに対する１次元目ゲル分離の比較的長い実行時間ではうまく絶縁しないので、通常は本発明での使用に適さない。

30

【００１６】

第１の電気泳動分離媒体は、取外し可能なカバーで少なくとも部分的に封入されており、このカバーは、通常は、分離すべきサンプルを含んだ液体を上記支持手段を鉛直姿勢にした状態で使用することにより、上記媒体の再水和を可能にすることが好ましい。

【００１７】

取外し可能カバーは、最も好ましくは金属箔等からなる。ＩＰＧストリップには保存条件に左右される使用期限がある。ＩＰＧストリップは、完全に乾燥した状態で保存すると、長い年月持つ。しかしながら、空気によりＩＰＧストリップが酸化され、大気中に存在する水蒸気もＩＰＧストリップの劣化速度を加速させるので、気密封止が好ましい。２Ｄスラブゲルの使用期限は普通１年であるので、ＩＰＧストリップに対する封止は、少なくともこの期間はＩＰＧストリップを良好な状態に維持することが望ましい。反対に、プラスチック膜は、金属箔ほど気密性はないので良好に密封できず、１年という必要期間ＩＰＧを維持しそうにはない。

40

【００１８】

支持手段を同じ鉛直姿勢の状態ですべての２次元電気泳動分離全体を実施できることにより、支持手段が水平方向、又は水平方向と鉛直方向の両方の姿勢をとる従来技術と比較してシステムの機械化がし易くなる。

【００１９】

非導電性の液体は水と不混和で、非常に疎水性であり、水を抽出せず、比較的低粘度のパラフィン油が最も好ましい。低粘度であることは、パラフィン油を比較的狭い（普通１ｍ

50

m~4mm) I P S ストリップとスラブゲルとの間の屈折した間隙に充填することができるので、好都合である。より粘度の高い材料であれば、より広い間隙が必要になる。間隙の大きさに従って、 $30\text{ mm}^2/\text{S}$ までの粘度の油が好ましく、通常は $10\sim25\text{ mm}^2/\text{S}$ の粘度の油が使用される。この場合、間隙を埋めるのに使用するアガロースの気孔の大きさがI P G ストリップと2 d スラブゲルの気孔よりも大きいので不利になってしまう。よって、拡散はアガロースゲル内で起こる傾向になる。間隙が狭いほど、通過時間が短くなり、拡散が起こり難いのでよい。

#### 【0020】

(発明の好ましい実施形態及び実施例の説明)

添付図面を参照にして、本発明の具体的な実施形態を以下に例示する。図面を参照すると、図1及び図2は、通常は乾燥固定化pH勾配(I P G)タイプのゲルである1次元ゲル12と2次元ゲル14を組み合わせた2-Dゲルカセット10の側面図及び上面図を各々示す。カセットは、ガラス製、プラスチック製、又は他の適切な材料製であってもよい。

10

#### 【0021】

I P G 12は、2次元ゲルの上面から2mm程度の間隙16を置いて配置されており、2次元ゲルの上面に略平行に向けられている。I P G 12の各端とカセット10の各側面の間は、2次元目分離のための電極橋渡し材料が挿入できるように約5mmの間隙18が保持されている。これらの図に示す装置には、1個のI P G 12が2次元ゲルの上面に平行に2次元ゲルから約2mmの間隔を置いて配置されているが、このような構成の組み合わせ式2-Dゲルには、2次元ゲルの上面から2mm程度の間隔で直線状に配置された1個以上のI P Gを含ませることもできることは、当業者にとって明らかである。

20

#### 【0022】

好ましい実施形態では、図3に示すように、I P Gは、カセットの1枚の平板20に固定されている。図3に示すように、乾燥I P Gは、金属箔の被覆シート22で被覆されており、被覆シート22も、カセットの平板に固定され、液体の浸透を阻止している。I P G ストリップには、通常、保存条件に左右される使用期限がある。I P G ストリップは、完全に乾燥し冷蔵又は冷凍した状態で保存された場合、長い年月持つことができる。しかしながら、空気によりI P G ストリップが酸化され、大気中に存在する水蒸気もI P G ストリップの劣化速度を加速させるので、金属箔により実施可能な気密封止が好ましい。2Dスラブゲルの使用期限は普通1年であるので、I P G ストリップに対する封止は、少なくともこの期間はI P G ストリップを良好な状態に維持することが望ましい。シートは、気体を通さない金属箔以外の材料からなってもよい。続いて、カセット10の前板が取り付けられ、カセット内に、2次元ゲル14が注入されることにより、カセットが完成する。

30

#### 【0023】

サンプルを装入するため、被覆シート116の片方の耳158に小さな穴が形成されており、液体サンプルは、カバーで形成されたI P G 12を囲む空間に導入される。吸収されない液体には全てタンパク質が含まれ、その結果、装入量が減少してしまうので、I P G 12を再水和するのに十分な量しか液体を導入しないことが重要である。乾燥I P G 12は、液体が全て吸収されるまで再水和される。再水和処理の後、片方或いは両方の耳158を取っ手として、カバー156をカセットからはぎ取るようにして取り外す。

40

#### 【0024】

利点は少なくなるが、別方法として、図1に示すようなI P Gカバーがないカセット内にサンプルを装入することが可能である。この実施形態では、I P Gゲルを上向き又は下向きにした状態で、図1に示すセットを図2に示すように水平に置き、シリンジで再水和用の液体をI P G表面に慎重に載せる。毛管作用により、再水和液がI P G表面上に保持され、空気がI P Gと2次元ゲルの間の間隙内で障壁の働きをし、再水和液が2次元ゲルに接触するのを防ぐ。図1に示すカセットの実施形態は、再水和処理中のゲル間の障壁として空気を使用しているが、このような構成の組み合わせ式2-Dゲルが再水和中の障壁として空気以外の気体、液体或いは固体を使用できることは、当業者にとって明らかである

50

## 【0025】

I P Gゲルの再水和後、図6及び図7に示すように、電極の橋をI P Gの各端と接触させて配置しなければならない。図7に示すように、電極橋渡し材料32が、カセット両端の幅広領域30内の所定位置に保持される。電極橋渡し材料は、一般的には肉厚の濾紙であり、所定の大きさに裁断され、純水で湿潤される。幅広領域30を有する利点は、より肉厚の濾紙の方が電極橋渡し材料として使用できるからである。これにより、ゲルへの電界印加中に電極橋渡し材料がI P Gには不必要な浮遊イオン物質を吸い上げる働きをするので、好都合である。しかしながら、電極材料は、固体材料、不活性材料、非イオン性材料、水分吸収性材料のいずれの材料からなってもよい。さらに、電極材料を、緩衝液や等電点電気泳動に使用されるようなサンプル可溶化溶液に浸漬させるのが望ましい場合もある。例えば、I P Gのp H範囲内に等電点がないタンパク質を除去し易くするために電極橋渡し材料に高い可溶化条件が必要なときは、等電点電気泳動可溶化溶液を使用してもよい。電極材料は、サンプルからの汚染イオンや非等電点タンパク質が分離を妨げることなく集まることができる、ゲルと電極の間の貯留部として作用する。幅広領域30を有する利点は、より肉厚の濾紙の方が浮遊イオン化物質をより多く吸い上げる電極橋渡し材料として使用できるからである。図6に示すように、電極34は、電極橋渡し材料内に貫入しかつ良好に接触できるように、通常はピン形状である。

10

## 【0026】

使用時には、電極橋渡し材料の挿入後、I P Gと2次元ゲルの間の間隙に障壁材料を充填して、等電点電気泳動工程中のI P Gの脱水を防ぎ、間隙間の導通を防ぐ。さらに、障壁材料は、等電点電気泳動中に1次元ゲルと2次元ゲルの間を液体が少しでも移動するのを防ぐ。障壁材料は、水に対して不混和性かつ水を抽出不可能なもの、すなわち水を全く吸収も吸着もしないものでなければならない。一般的には水と不混和であると言われながら、実際には、飽和して2層化する前に多量の水を吸収する可能性がある溶媒が多数存在する。このような溶媒は、まだ水分飽和していない場合にはゲルやI P Gストリップから水を取り出す可能性があり、飽和している場合には、12時間から48時間はかかるI P Gストリップに対する1次元目ゲル分離の比較的長い実行時間ではうまく絶縁しないので、通常は本発明での使用に適していない。

20

## 【0027】

好ましい実施形態では、障壁材料は、オーストラリア国ビクトリア州3000メルボルン、スプリングストリート1のシェル・カンパニー・オブ・オーストラリアン・リミテッド (the Shell Company of Australian Limited) が供給する“Shell Ondina Oil 15”等の軽パラフィン油である。このパラフィン油は、どのような化学的活性度の物質も除去するよう高度に精製された医薬品用白色精製パラフィン油であり、必然的に、非常に低刺激性で化学的に不活性なウォータールホワイト製品である。この製品は、I S O粘度グレード32及び64で入手可能であるが、I S O粘度グレード15が、 $15.6 \text{ mm}^2 / \text{s}$ の40℃標準粘度をもつ好ましい粘度グレードである。しかしながら、より高密度又はより低密度のパラフィン油や他の油も上記の特性を満たすならば好ましい障壁材料になり得ることは、当業者にとって明らかである。障壁材料は、最も好ましくは室温では液体である。図8に示すように、カセットを鉛直姿勢にして、パラフィン油がピペットで挿入される。電極は、電極橋渡し材料内に設置され、カセットを鉛直姿勢にしたまま等電点電気泳動が行われる。

30

40

## 【0028】

等電点電気泳動後にI P Gから2次元ゲルへタンパク質を容易に移動させるためには、I P Gを適切な緩衝液で平衡化させる必要がある。典型的な2-Dゲルの場合、平衡化用緩衝液として、ジチオトレイトールやトリブチルホスフィン等の還元剤が含まれ、界面活性剤として、タンパク質と結合して全てに優先する負電荷を付与するドデシル硫酸ナトリウム (S D S) が含まれる。この負電荷により、2次元目における分子量に応じたタンパク質の分離が可能となる。本発明の好ましい実施形態では、I P G平衡化及びS D S結合は

50

、パラフィン油障壁をSDS溶液及び上記適切な緩衝液を含有する0.5%溶融アガロースに入れ換えることにより行われる。好ましい実施形態では、タンパク質は、1次元目の分離の前に還元及びアルキル化される。しかしながら、1次元目の分離時にタンパク質が還元された形で分離された場合は、ジチオトレイトールやトリブチルホスフィン等の還元剤がアガロースに添加される。パラフィン油は、溶融アガロース（普通1～5mL）溶液を1次元ゲルと2次元ゲルの間の間隙に流すことにより、完全に除去される。最後に、SDS、グリセロール及び緩衝液を含有する溶融アガロースを1次元ゲルと2次元ゲルの間の間隙内で固化させることにより、間隙を埋めてタンパク質の移動を可能にする。高温アガロースの添加を容易にするためには、カセットを図8に示すように傾斜させた鉛直姿勢にすることが必要である。間隙から気泡を出し終え、カセットを図6に示すような通常の鉛直姿勢に戻し、室温で20分間放置し、アガロースを固化させてトリブチルホスフィンとSDSをIPG内へ拡散させる。放置時間は、サンプルとタンパク質の荷重に依存し、零分から20分間以上まで変更してもよい。このシステムは単純で自動化に向いているので、特に好ましい。

10

#### 【0029】

上記の実施形態ほどではないが、好ましい本発明の別の実施形態では、尿素、SDS、還元剤、緩衝液、及びグリセロールを含有する従来の平衡化用溶液を間隙に流し、パラフィン障壁と入れ換えることが可能である。この平衡化用溶液をカセット内に5分間から30分間留まらせて、通常10回まで取り換える。しかしながら、当業者には明らかなように、本発明の精神から逸脱することなく、また得られるゲルを損傷させることなく、平衡化に要する時間及び取換え回数を変更してもよい。

20

#### 【0030】

2次元ゲルの実験とそれに続く染色は通常の手順に従って行われる。図9は、図1に示すカセットで実験したネズミの肝臓の銀染色2-Dゲルを示す。再水和工程と等電点電気泳動工程が良好に作用し、使用された障壁材料によりサンプルの2次元目への早過ぎる移動が防がれていることが判る。

#### 【0031】

ある好ましい実施形態では、カセット10は、前パネル116と後パネル118を備えている。図12及び図13に示すように、前パネル116は、前面120、後面122、上端124、下端126、左側端128、及び右側端130を有する。前パネル116の後面122には、左側端128及び右側端130に隣接してスペーサ片132及び134が設けられている。図10及び図11に示すように、後パネル118は、前面136、後面138、上端140、下端142、左側端144、及び右側端146を有する。後パネル118の前面132には、左側端142及び右側端144に隣接してスペーサ片148及び150が設けられている。前パネルは、プラスチック、ガラス、その他の適切な材料で作成可能であるが、透明で比較的安価であり成形し易いので、プラスチックが好ましい。

30

#### 【0032】

前パネル116と後パネル118は、後パネル118の前面136を前パネル116の後面122に対向させ、スペーサ片132及び134をスペーサ片148及び150と位置合わせした状態で、結合される。前パネル116と後パネル118を粘着手段、超音波溶接手段、又は他の適切な手段で結合することも可能である。前パネル116のスペーサ片132、134、及び後パネル118のスペーサ片148、150には、両パネルを位置合わせしたり両パネルを結合したりするのに役立つように、嵌合部及び／又は係合部を形成することも可能である。別の構造では、スペーサを前パネル116のみ（図15B参照）や後パネル118のみ（図15C参照）に設けることも、又はカセットの片側のスペーサを前パネルに、カセットのもう片方のスペーサを後パネルに設ける（図15D参照）ことも可能である。また、別体のスペーサを後パネル上に設ける（図15E参照）ことも可能である。さらに別の構造では、スペーサを、前パネルと後パネルの間に各々の下端に沿って設けることも可能である。このスペーサは、前パネル及び後パネルのスペーサ片、前パネルのみ又は後パネルのみのスペーサ片、又は別体としてのスペーサ片により形成する

40

50

ことも可能である。しかしながら、通常は2次元ゲル14の形成を容易にするためにカセット10の底面が開放していることが好ましい。

#### 【0033】

後パネル118の前面136は、好ましくは、IPG12を収容し保持する窪み又は凹部152を有している。IPG12は、接着剤、クリップ又は留め具で窪み又は凹部152内に固定することができる。本実施形態では、IPGを凹部152内に固定するために、後パネルに一体的に形成された弾性クリップ154が設けられている。取外し可能なカバー156がIPG12上に設けられている。好ましくは、カバー156は後パネル118に封着されているが、容易に除去できる。カバー156はIPG12を保護し、IPGの再水和を行い易くする。カバー156は好ましくは撓み性のシート材料よりなり、カセット10の上面を越えて上方に延びる“耳”158を少なくとも1個、好ましくは2個有する。したがって、この耳から、カバーを開けてIPG12を再水和し、その後、カバーを把持して後パネル118から除去することができる。これらの耳158は、好ましくは閉端の管形である。好ましくは、カバー156は、頑丈で撓み性があるが、液体や気体を封止できるような金属箔からなる。金属箔の導電性も、カバー及び／又はIPG12を劣化させる恐れのある局所的腐食を妨げるのに役立つ。金属箔を耐腐食性やカバーの強度を向上させる膜や塗料等の導電性プラスチック層と結合させることも可能であり、その結果、除去中の破砕が防止される。カバー156を接着剤や超音波溶接により固定することも可能である。水分により柔らかくなる接着剤は、IPG12が再水和していくにつれて弱くなりカバー156の除去が容易になるという利点がある。

#### 【0034】

別の構造として、図14Aに示すように、カバー156にはタブ160と脆弱線162及び164が構成されており、タブを引張るとカバーの中央部のみが除去され、各端は残されて、各々の導電性により1次元目分離用の電極として使用することができる。別のカバーの構造としては、撓み性のカバー以外に、剛性のカバーが含まれる。

#### 【0035】

後パネル118の前面136には、溝又は流路が形成可能で、IPG12と接触する紙電極の挿入が容易になる。

#### 【0036】

前パネル116は切開部166を有するので、カセット10同士を向かい合わせに結合すると、1次元目中に絶縁材を保持するための連続上の貯蔵部がカセット間に形成される。

#### 【0037】

実施形態に示す発明に対し、概略して述べられている本発明の精神や範疇から逸脱することなく、多数の変更及び／又は修正が可能であることは、当業者には理解されよう。従って、本実施形態は、あらゆる面で例示とみなされるべきであり、限定するものとみなされるべきではない。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

図1は、1つのカセットと一緒に配置されたIPGゲルと2次元ゲルを示す組み合わせ式2-Dゲルの概略側面図である。

##### 【図2】

図2は、1つのカセットと一緒に配置されたIPGゲルと2次元ゲルを示す組み合わせ式2-Dゲルの概略上面図である。

##### 【図3】

図3は、組立てと2次元ゲル注入の前のカセットの1枚の平板の2方向の概略側面図を示す。IPGはカセット平板に取り付けられ、プラスチック薄層で覆われている。

##### 【図4】

図4は、IPGが図3のプラスチック被覆シートで覆われている、完全に組み立てられた図1のカセットを示す。

##### 【図5】

図 5 は、再水和溶液がカセット壁とプラスチック被覆シートの間の I P G を含む間隙に導入された状態の、図 4 で図示されたカセットを示す。

【図 6】

図 6 は、I P G ゲルの各端での電極橋渡し材料と電極の位置関係を示す組み合わせ式 2 - D ゲルの概略側面図である。

【図 7】

図 7 は、I P G ゲルの各端での電極橋渡し材料の位置関係を示す組み合わせ式 2 - D ゲルの概略上面図である。

【図 8】

図 8 は、パラフィン油障壁材料の装入を容易にするようにカセットを傾けた状態の、図 3 と同様の組み合わせ式 2 - D ゲルの概略側面図である。 10

【図 9】

図 9 は、図 1 ないし図 4 に示すカセット構成により実験された銀染色 2 次元ゲルである。

【図 10】

図 10 は、本発明の原理に従って構成されたカセットの背板の正面図である。

【図 11】

図 11 は、図 10 の線 1・1 - 1 1 における面に沿う背板の横断面図である。

【図 12】

図 12 は、カセットの前板の正面図である。

【図 13】

図 13 は、図 12 の線 1 3 - 1 3 における面に沿う前板の横断面図である。

【図 14】

図 14 は、組立て状態のカセットの正面図である。

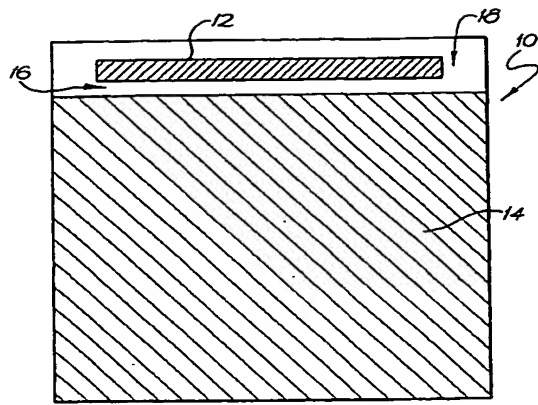
【図 14 A】

図 14 A は、別構造の組立て状態のカセットの正面図である。

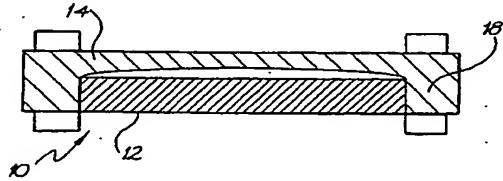
【図 15】

図 15 A ないし図 15 E は、別構造のカセットの横断面図である。

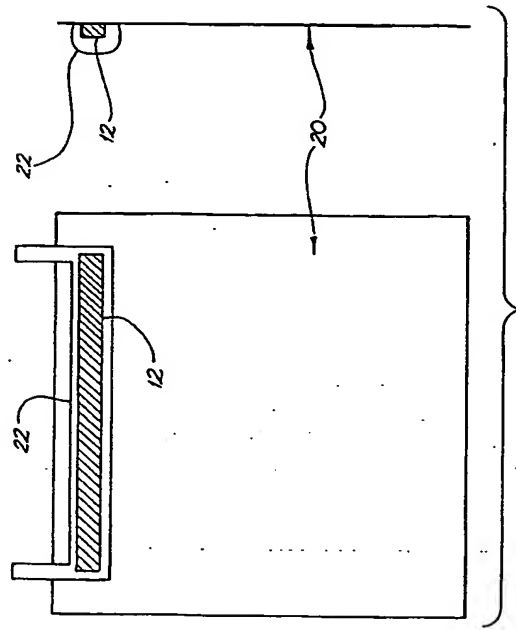
【図 1】



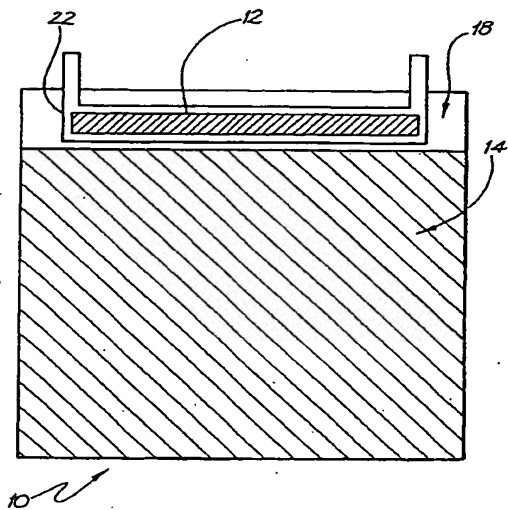
【図 2】



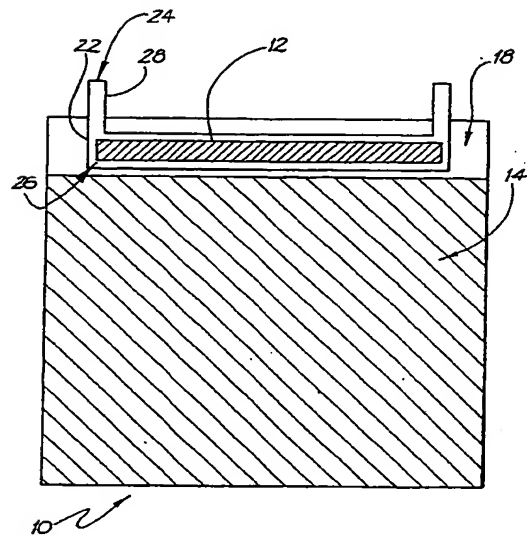
【図 3】



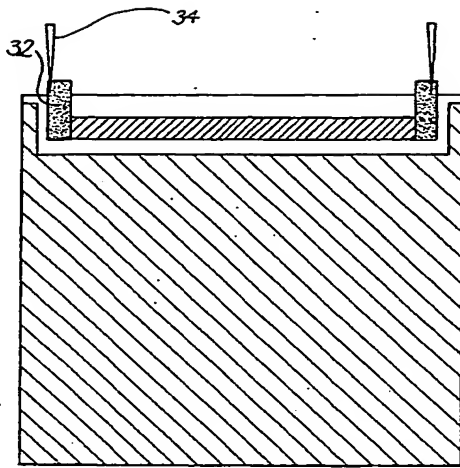
【図 4】



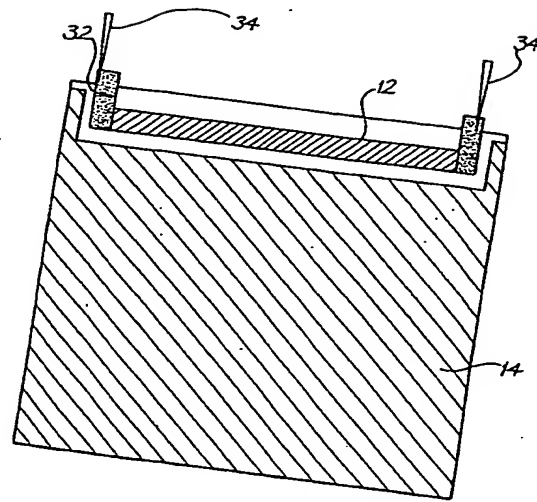
【図 5】



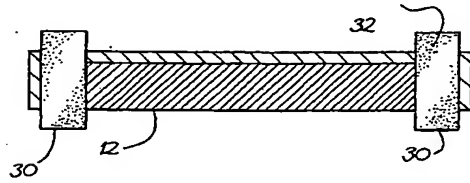
【図 6】



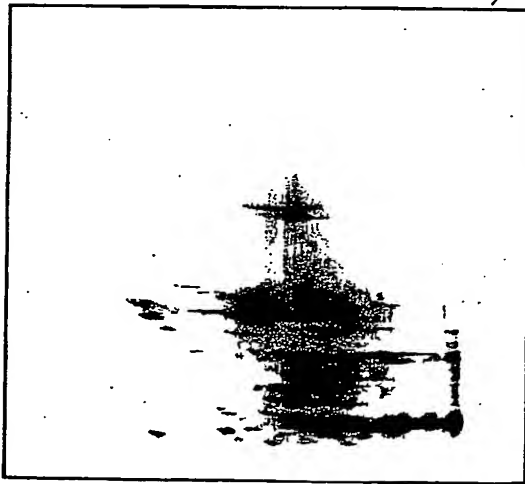
【図 8】



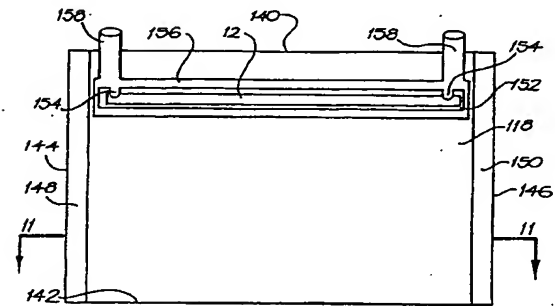
【図 7】



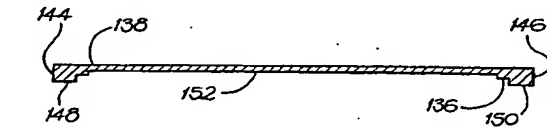
【図 9】



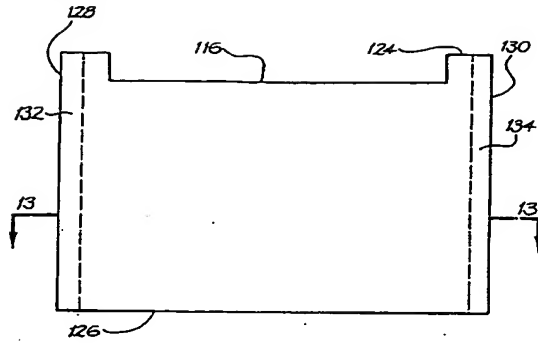
【図 10】



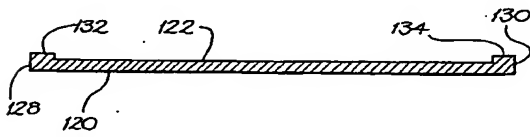
【図 11】



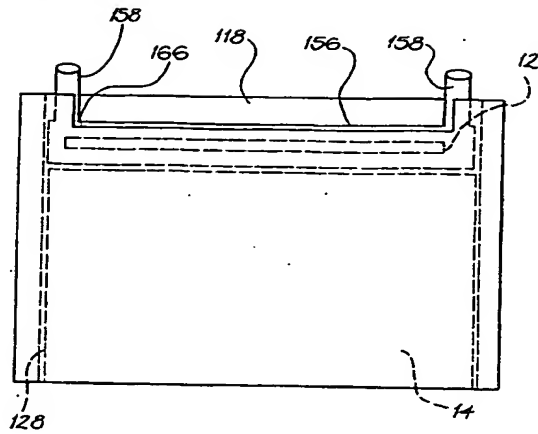
【図 12】



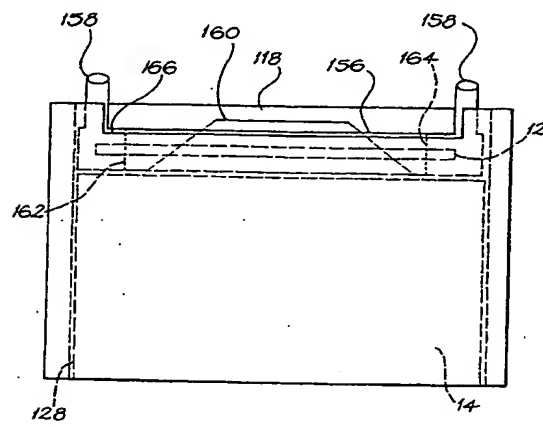
【図 13】



【図 14】



【図 14 A】



【図 15】

